

Predição computacional de alvos moleculares de um complexo metálico de rutênio com episopiloturina e óxido nítrico

Computational prediction of molecular leishmania targets for a ruthenium metal complex with episopiloturine and nitric oxide

Joabe Lima Araújo^{†, ‡, §, ¶, O*}, Gardênia Taveira Santos[§], Ruan Sousa Bastos^{‡, ¶, O}, Francisco das Chagas Alves Lima^{||}, Jefferson Almeida Rocha^{‡, O}

Como citar esse artigo. Araujo, J.L.; Santos, G.T.; Bastos, R.S.; Lima, F.C.A.; Rocha, J.A. Predição computacional de alvos moleculares de um complexo metálico de rutênio com episopiloturina e óxido nítrico. *Revista de Saúde*. 2020 Jan./Jun.; 11 (1): 42-48.

Resumo

A Leishmaniose é uma doença infecciosa que ocasiona a morte de 26.000 a 65.000 pessoas anualmente, estima-se que no ano de 2019 houve 700.000 a 1 milhão de novos casos. Estes dados são preocupantes e está relacionado à falta de saneamento básico que favorece a proliferação dos vetores, além da ausência de medicamentos eficientes com mecanismos de ação alternativos e com menos efeitos colaterais. Em meio a essa necessidade de novos agentes inibitórios, este estudo teve como objetivo realizar uma predição computacional de alvos moleculares de *Leishmania* para um complexo metálico de rutênio com episopiloturina e óxido nítrico (Epiruno₂). O processo de *docking* molecular foi realizado empregando-se o *software Autodock Tools* (ADT) versão 1.5.6. As proteínas alvos foram consideradas rígidas, enquanto que o Epiruno₂ foi considerado flexível. A glicoproteína GP63 (1lml) representa mais de 1% da proteína total do parasito tendo em vista que a 1lml é uma metaloprotease que predomina grupos funcionais em seu sítio ativo, torna-se um alvo atrativo em estudos de atividade inibitória. O *docking* molecular entre o Epiruno₂ e a 1lml resultou na melhor conformação de encaixe deste estudo, com energia de G_{bind}^a de -8,05 Kcal.mol⁻¹ e uma constante de inibição de 1,26 μM. Também foi observada a formação de quatro pontes de hidrogênio, demonstrando ser um forte candidato a fármaco antileishmania. Concluindo-se que o composto Epiruno₂ é clinicamente atrativo para estudos experimentais futuros *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*, pois seus resultados *in silico* apresentaram boas interações moleculares para todas as proteínas alvo deste estudo.

Palavras-chave: Simulação de Acoplamento Molecular, Leishmaniose, Doença Negligenciada, atividade antileishmanial.

Abstract

Leishmaniasis is an infectious disease that causes the death of 26,000 to 65,000 people annually, it is estimated that in 2019 there were 700,000 to 1 million new cases. These data are worrying and are related to the lack of basic sanitation that favors the proliferation of vectors, in addition to the absence of efficient drugs with alternative mechanisms of action and with less side effects. Amid this need for new inhibitory agents, this study aimed to perform a computational prediction of *Leishmania* molecular targets for a ruthenium metal complex with episopiloturine and nitric oxide (Epiruno₂). The molecular docking process was performed using the Autodock Tools (ADT) software version 1.5.6. The target proteins were considered rigid, while Epiruno₂ was considered flexible. The glycoprotein GP63 (1lml) represents more than 1% of the total protein of the parasite, considering that 1lml is a metalloprotease that predominates functional groups in its active site, it becomes an attractive target in studies of inhibitory activity. The molecular docking between Epiruno₂ and 1lml resulted in the best fit conformation in this study, with G_{bind} energy of -8.05 Kcal.mol⁻¹ and an inhibition constant of 1.26 μM. The formation of four hydrogen bonds was also observed, demonstrating to be a strong candidate for antileishmania drug. In conclusion, the compound Epiruno₂ is clinically attractive for future experimental studies *ex vivo*, *in vitro* and *in vivo*, as *in silico* results showed good molecular interactions for all the target proteins in this study.

Keywords: Molecular Docking Simulation, Leishmaniasis, Neglected Diseases, Antileishmanial activity.

Introdução

A Leishmaniose é uma doença infecciosa que ocasiona a morte de 26.000 a 65.000 pessoas anualmente, estima-se que no ano de 2019 houve 700.000 a 1 milhão de novos casos¹. Estes dados são preocupantes, pois em pleno século XXI possuímos números elevados de casos de *Leishmania*, isso está relacionado à falta

de saneamento básico que favorece a proliferação dos vetores, além da ausência de medicamentos eficientes devido à falta de interesse das indústrias farmacêuticas em produzir novas drogas com mecanismos de ação alternativos e com menos efeitos colaterais, pois grandes empresas farmacêuticas encerraram seus programas de pesquisa contra doenças negligenciadas e se concentraram em áreas terapêuticas potencialmente

Afiliação dos autores:

[†]Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Departamento de Genética e Morfologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

[‡]Grupo de Pesquisa em Ciências Naturais e Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão, CIENATEC/UFMA, Grajaú, MA, Brasil.

[§]Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual do Maranhão, Colinas, MA, Brasil.

[¶]Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil

^{||}Departamento de Química, Laboratório de Química Quântica Computacional, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

^OGrupo de pesquisa em Química Medicinal e Biotecnologia, QUIMEBIO, Universidade Federal do Maranhão, São Bernardo, MA, Brasil

* Email de correspondência: joabearaujobiotec@gmail.com

Recebido em: 10/03/20. Aceito em: 23/04/20.

mais lucrativas².

Isso ocorre devido ao público alvo, pois a doença se concentra em países subdesenvolvidos e não possuem poder econômico de investir e financiar tratamento para as pessoas diagnosticadas com a doença. Deste modo, cepas parasitárias se tornam cada vez mais resistentes e os medicamentos diminuem sua eficácia, além de serem potencialmente tóxicos³. Pois os fármacos Glucantime, antimoniato de meglumina e estiboglucnato de sódio (SSG), medicamentos de primeira linha contra a leishmaniose estão em uso desde a década de 1950 e não passaram por otimizações, em alguns casos a eficácia destes fármacos chega a apenas 10% como foi evidenciado em casos de *Leishmania* na Índia⁴.

Isso mostra a necessidade de desenvolver novas substâncias com novos mecanismos de ação que apresente menos efeitos colaterais e alta eficácia. Associado a isso, temos estudos disponíveis na literatura sobre o uso de complexos metálicos para impulsionar a atividade biológica de compostos orgânicos em reação a uma proteína alvo, diversos medicamentos usados atualmente no tratamento de infecções por tripanossomatídeos possuem em sua composição metais, a exemplo do arsênico e antimônio⁵. No entanto, a compostos contendo outros metais, como prata, paládio, platina e rutênio que vêm apresentando resultados promissores em inibir proteínas-chave de *Leishmania*^{6,7,8}.

Um estudo realizado por Araújo *et al.*³ mostrou que um complexo de rutênio com epiisopiloturina e óxido nítrico (Epiruno₂) obteve resultados atrativos de afinidade molecular para a proteína Nucleoside-diphosphate kinase de *L. major*. Baseando-se nestes estudos, partimos da hipótese que o Epiruno₂ apresente importante afinidade molecular para proteínas-chave de *Leishmania* através de estudos por simulação computacional.

Nesse sentido, a química computacional vem se mostrando eficiente em análises de afinidade molecular entre compostos orgânicos ou sintéticos e alvos estratégicos de patógenos através do *docking* molecular⁹. Uma ferramenta promissora em prever a melhor orientação de ajuste de encaixe de um ligante em uma proteína alvo, permitindo observar o comportamento dos compostos no sítio ativo de ligação dessas proteínas, assim como, elucidar as interações moleculares geradas pelo acoplamento. Este processo envolve predição da conformação, posição e orientação do ligante nos sítios de ligação e análise da afinidade molecular¹⁰.

Estes testes auxiliam na descoberta de novos inibidores de proteínas estratégicas de patógenos, pois avalia a afinidade molecular de compostos ligados a proteínas alvo, e identifica os tipos de interações geradas no local de ligação. Desta forma, auxilia na escolha de candidatos promissores para testes em laboratórios economizando tempo e reagentes que

seriam desperdiçados¹¹. Assim, este estudo teve como objetivo realizar uma predição computacional de alvos moleculares de *Leishmania* para um complexo metálico de rutênio com epiisopiloturina e óxido nítrico (Epiruno₂).

Materiais e Métodos

Obtenção da geometria molecular tridimensional do Epiruno₂ empregando-se de cálculos quânticos computacionais

A estrutura química do Epiruno₂ foi desenhada utilizando-se o *software GaussView 5.01*², gerando as matrizes de coordenadas cartesianas correspondentes, para que seja gerado o arquivo de entrada e ser realizado os cálculos quânticos computacionais¹³. Uma vez gerado o arquivo de entrada, os cálculos foram submetidos no *software Gaussian 09W*¹⁴, onde os cálculos de otimização da geometria molecular e de frequências vibrações da estrutura foram realizados empregando-se o método funcional DFT B3LYP, do conjunto de funções de base 6-311G⁺⁺(d,p), com o intuito de obter a geometria molecular tridimensional que seja mais próximo possível da realidade.

Interações moleculares entre os alvos de *L. major* com o Epiruno₂ por *Docking* molecular

As estruturas em 3D dos alvos de *L. major* foram obtidas no banco de dados de proteínas PDB - *Protein Data Bank*¹⁵, onde foram selecionadas as proteínas mais atrativas em estudos com complexos metálicos. Em seguida, as proteínas alvos selecionadas foram preparadas com a remoção de todas as moléculas de água e outros grupos, como íons, empregando-se o *software CHIMERA v.13.1*¹⁶.

O processo de *docking* molecular foi realizado empregando-se o *software Autodock Tools (ADT) versão 1.5.6*¹⁷. O protocolo de Rocha *et al.*¹⁸ Para *docking* molecular com estruturas metálicas foi referência para este estudo. As proteínas alvos foram consideradas rígidas, enquanto que o Epiruno₂ foi considerado flexível. As cargas parciais Gasteiger¹⁹ foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Os átomos de hidrogênio não polares de proteínas e ligantes foram subsequentemente mesclados. Foi gerada uma caixa cúbica de 60 x 60 x 60 pontos com resolução de 0,375 Å entre os pontos da grade para todo o alvo da proteína. Os centros das grades de afinidade molecular foram definidos a partir das coordenadas do sítio ativo de cada proteína alvo selecionada.

O algoritmo genético Lamarckiano (LGA) com busca global e pseudo-Solis e Wets com busca local foram os métodos utilizados no processo de *docking*

molecular²⁰. Cada simulação consistiu de 100 corridas independentes. O restante dos parâmetros de *docking* foi definido com os valores padrões^{21,22}.

Resultados e Discussão

A glicoproteína GP63 ou leishmanolisina (1lml) representa mais de 1% da proteína total do parasito de *Leishmania*, tendo em vista que a 1lml é uma metaloprotease que predomina grupos funcionais em seu sítio ativo, torna-se um alvo atrativo em estudos de atividade antileishmania²³. O *docking* molecular entre o Epiruno₂ e a proteína alvo 1lml, resultou em uma energia de G_{bind}^a de $-8,05 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e uma constante de inibição de $1,26 \mu\text{M}$ (Tabela 1). O complexo gerado formou quatro pontes de hidrogênio nos resíduos de aminoácidos Glu265, His264, His268 e His334, onde destacamos que além de apresentar afinidade molecular, as interações por ligações de hidrogênio são os locais

em que agem as maiores forças intermoleculares deste complexo (Figura 1).

A proteína Dihidroorotate dehydrogenase ou DHODH (4ef8) possui poucos análogos de pirimidina como inibidores baseado em substrato que ligam no sítio ativo de diidroorotato²⁴. Os inibidores conhecidos são ligados a DHODH de classe II, que são ligadas em um cofator de ubiquinina²⁵. A maioria dos inibidores de DHODH de classe II, não é eficaz contra a DHODH de classe IA, já que seu sítio de ligação é a quinona. Esses inibidores específicos apenas agem especificamente o DHODH de classe IA *Lactococcus lactis* e *T. brucei* e análogos de orotato que apresenta inibição contra *T. cruzi* e *L. major*^{26,27,28}.

O Epiruno₂ apresentou bons resultados com esta proteína, obtendo atividade inibitória frente à DHODH de *L. major* de classe IA com uma constante de inibição de $2,17 \mu\text{M}$, e uma energia de G_{bind}^a de $-7,73 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ (Tabela 01). As interações mais eletronegativas acontecem nos aminoácidos Arg105 e Asn133, onde são

Tabela 1. Parâmetros de afinidade molecular do Epiruno₂ com as proteínas alvos de *L. major*.

Complexo (proteína-ligante)	ΔG_{bind}^a (kcal.mol ⁻¹)	Ki ^b (μM)	Número de Corridas de Encaixe Independentes	Número de Conformações no Primeiro Cluster	Aminoácidos que Interagem Através de Ligações de Hidrogênio
Epiruno ₂ /1lml	-8,05	1,26 μM	100	8	Glu265, His264, His268, His334
Epiruno ₂ /4ef8	-7,73	2,17 μM	100	7	Arg105, Asn133
Epiruno ₂ /5142	-7,62	2,6 μM	100	7	Lys244
Epiruno ₂ /3ogz	-6,71	12,16 μM	100	5	Lys134
Epiruno ₂ /3tue	-6,58	14,91 μM	100	27	Asp47, Phe50, Val51
Epiruno ₂ /2xe4	-6,12	32,8 μM	100	1	Ala80, Asp78, Leu82

Nota: Epiruno₂ – Complexo de rutênio com epiisopiloturina e óxido nítrico; 1lml - glicoproteína GP63 ou leishmanolisina; 4ef8 - Dihidroorotate dehydrogenase; 5142 - Pteridine reductase 1; 3ogz - UDP-sugar pyrophosphorylase; 3tue - tryparedoxin peroxidase; 2xe4 - oligopeptidase B.

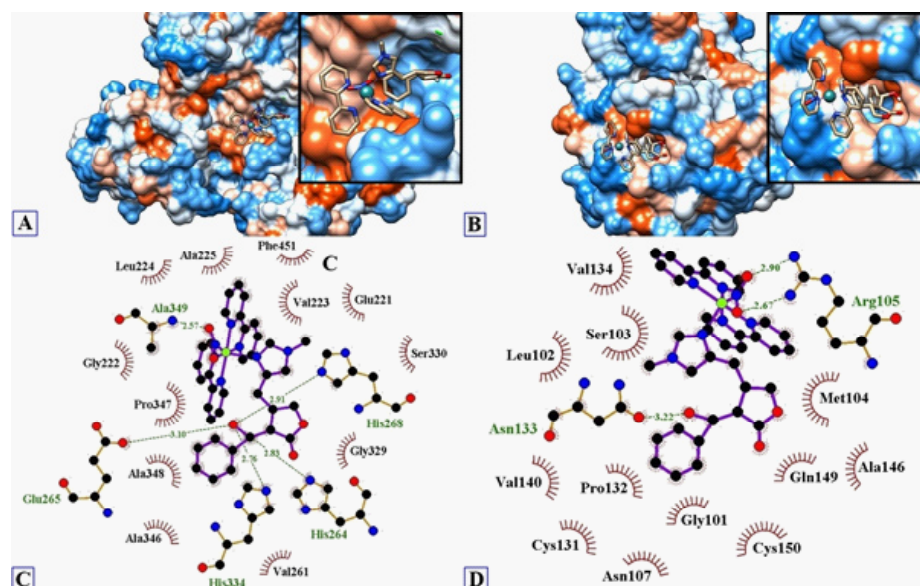


Figura 1. Docking molecular entre o Epiruno₂ e as proteínas alvo 1lml e 4ef8.

Nota: A) ancoragem no sítio ativo da proteína alvo 1lml; B) ancoragem no sítio ativo da proteína alvo 4ef8; C) interação molecular entre o 1lml e o Epiruno₂; D) interação molecular entre o 4ef8 e o Epiruno₂.

localizadas as pontes de hidrogênio, locais de maiores forças intermoleculares entre o DHODH de *L. major* de classe IA e o Epiruno₂ (Figura 01).

O docking molecular do Epiruno₂ e a proteína Pteridine reductase 1 de *L. major* ou LmPTR1 (5142), obteve uma energia de G_{bind}^a de $-7,62 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e uma constante de inibição de $2,6 \mu\text{M}$. O complexo gerado formou uma ligação de hidrogênio no aminoácido Lys244 (Tabela 1), local onde a força intermolecular do complexo é mais intensa. A LmPTR1 é um alvo atrativo para descobertas de drogas antitrypanosomal e antileishmanial²⁹. A literatura mostra diferentes arcabouços, como pteridina, pirrolopirimidina e benzimidazol, onde relata que a ligação inibitória da atividade da PTR1 é no biopterina^{30,31,32,33}.

A proteína USP é o homólogo de artrópodes do receptor X retinóide de vertebrados (RXR α , β , γ ; NR2B1, 2, 3), moluscos e cnidários³⁴. A USP também é uma proteína especialista em diferentes tipos de ligações ao DNA classificada como heterodimerização, que é uni presente para NRs classe II³⁵. Em *L. major*, a UGP leva a um fenótipo moderado associado à atividade residual da UGP, que ocorre devido a USP³⁶. A estrutura das UGPs possui um arranjo estrutural comum que adotam uma estrutura tripartida com um pequeno domínio catalítico central, onde possui uma dobra em sanduíche $\alpha/\beta/\alpha$ semelhante à Rossmann e um domínio C-terminal em hélice β ^{37,38}.

As UGPs de *L. major* e de plantas são semelhantes em sua ativação, ambas são ativas como monômeros³⁹, que após a ligação do Epiruno₂ a proteína UGP de *L. major* mostra alterações em sua conformidade envolvendo o domínio C-terminal em direção ao sítio ativo e rearranjos em alças funcionais do domínio

catalítico⁴⁰ como observados na Figura 2. Os resultados residuais do docking molecular da proteína UDP-sugar pyrophosphorylase de *L. major* (3ogz) com o Epiruno₂ obteve uma energia de G_{bind}^a de $-6,71 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e uma constante de inibição de $12,16 \mu\text{M}$ (Tabela 1). O complexo formado resultou em uma ligação de hidrogênio no resíduo de aminoácido Lys134, local em que acontece a ligação mais intensa deste complexo. Os aminoácidos Arg127, Asp271, Gln270, Glu126, Gly122, Gly123, His224, Leu124, Leu128 e Val120 realizam as interações hidrofóbicas (Figura 2 (D)).

O docking molecular do tryparedoxin peroxidase de *L. major* (3tue) com o Epiruno₂ apresentou uma energia de G_{bind}^a de $-6,58 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e uma constante de inibição de $14,91 \mu\text{M}$ (Tabela 01), mostrando possuir atividade anti-tryparedoxin peroxidase de *L. major*. O 3tue tem sido um alvo atrativo para pesquisas antileishmania por conter um metabolismo hidroperóxido dependente de tripanotiona, pois além desse parasita não conter catalase, também possui peroxidases dependentes de selênio, redutase da glutatona e da tioredoxina redutase e por possuir uma defesa antioxidante baseada em um sistema de enzimas dependente da tripanotiona ditio único (N1, N8-bis (glutationilo) espermidina, T (SH)₂)⁴¹. Desta forma, tem levado cientistas a estudarem seu metabolismo e desenvolver novas alternativas de tratamento necessárias devido à baixa eficácia e segurança dos atuais medicamentos⁴². A ilustração do docking molecular do complexo Epiruno₂/3tue está disponível na Figura 2 (B, E).

A oligopeptidase B (OPB) é uma sirina peptidase com dibásico especificidade do substrato. Podendo ser encontrada restritamente em plantas, bactérias e patógenos tripanossomatídeos, tornando-se um fator de

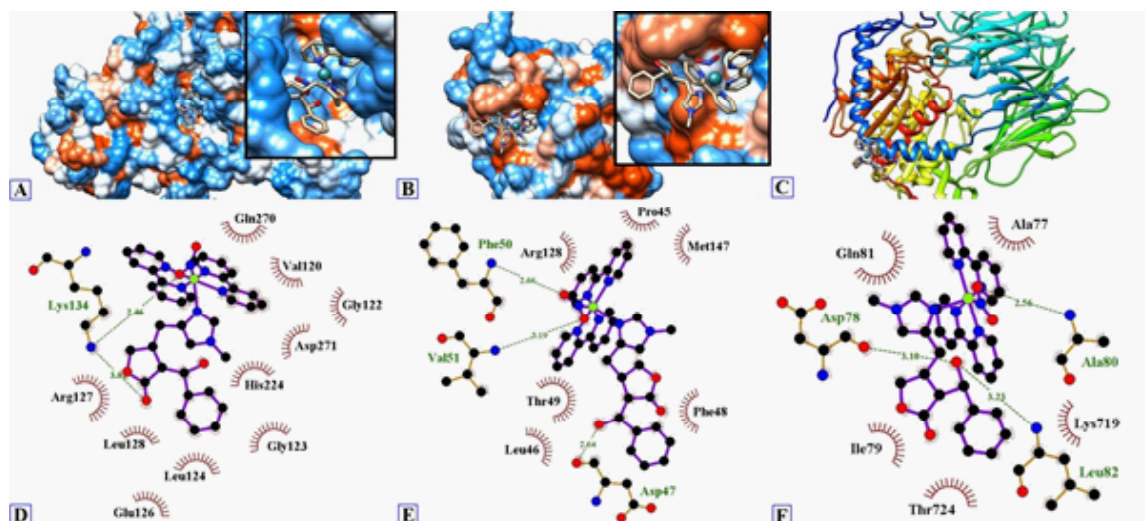


Figura 2. Docking molecular entre o Epiruno₂ e as proteínas alvo 3ogz, 3tue e 2xe4.

Nota: A) ancoragem no sítio ativo da proteína alvo 3ogz; B) ancoragem no sítio ativo da proteína alvo 3tue; C) ancoragem no sítio ativo da proteína alvo 2xe4; D) interação molecular entre o 3ogz e o Epiruno₂; E) interação molecular entre o 3tue e o Epiruno₂; F) interação molecular entre o 2xe4 e o Epiruno₂.

virulência atrativo em estudos farmacológicos⁴³. A OPB foi identificada em diversas espécies de *Leishmania* incluindo as espécies de *L. major* e *L. mexicana*⁴⁴. Atualmente possuem apenas três fármacos que inibem a OPB de *L. major*, que são: pentamidina, diminazeno e suramina^{45,46}. O Epiruno₂ se apresenta como um agente inibidor alternativo que apresentou uma interação molecular interessante clinicamente⁴⁷, possuindo uma energia de G_{bind}^a de $-6.12 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e uma constante de inibição de $32.8 \mu\text{M}$. O complexo gerado formou três pontes de hidrogênio ligadas nos resíduos de aminoácidos Ala80, Asp78 e Leu82. Estas ligações são responsáveis pelas interações de maiores forças intermoleculares do complexo Epiruno₂/2xe4 (Tabela 1). Os aminoácidos Ala77, Gln81, Ile79, Lys719, Thr724 realizam as interações hidrofóbicas (Figura 2 (F)).

Conclusão

O composto Epiruno₂ se apresentou atrativo para estudos experimentais futuros *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, pois seus resultados *in silico* apresentaram boas interações moleculares para todas as proteínas tridimensionais de *L. major* analisadas neste estudo. Destacando-se o complexo Epiruno₂/1lml gerado, que resultou em uma excelente afinidade molecular com energia de G_{bind}^a de $-8,05 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. Estes resultados *in silico* apresentam o Epiruno₂ como possível candidato a fármaco contra a leishmaniose, porém este composto deve ser submetido a testes experimentais para viabilizar e comprovar sua atividade leishmanicida apresentada neste estudo de predição computacional.

Referências

1. WHO. Control of Leishmaniasis Report of a meeting of the WHO Committee of Experts on the Control of Leishmaniasis. 2019. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
2. Theuretzbacher U. Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn? *International Journal of Antimicrobial Agents* [Internet]. Elsevier BV; 2009;34(1):15-20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.02.005>
3. Araújo JL, Santos GT, Sousa LA de, Santos GT, Silva WDF, Sousa ADO, et al. Molecular docking of ruthenium complex with epiisopyloturin and nitric oxide against nucleoside diphosphate kinase protein *Leishmania*. *Research, Society and Development* [Internet]. 2020;9(2):59922121. Available from: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i2.2121>
4. Khamesipour A. Therapeutic vaccines for leishmaniasis. *Expert Opinion on Biological Therapy* [Internet]. Informa Healthcare; 2014;14(11):1641-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2014.945415>
5. Colotti G, Ilari A, Fiorillo A, Baiocco P, Cinellu MA, Maiore L, et al. Metal-Based Compounds as Prospective Antileishmanial Agents: Inhibition of Trypanothione Reductase by Selected Gold Complexes. *ChemMedChem* [Internet]. 2013;n/a–n/a. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201300276>
6. Baiocco P, Ilari A, Ceci P, Orsini S, Gramiccia M, Di Muccio T, et al. Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione Reductase Activity and *Leishmania* infantum Proliferation. *ACS Medicinal Chemistry Letters* [Internet]. 2010;2(3):230-3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ml1002629>
7. Otero L, Vieites M, Boiani L, Denicola A, Rigol C, Opazo L, et al. Novel Antitrypanosomal Agents Based on Palladium Nitrofurylthiosemicarbazone Complexes: DNA and Redox Metabolism as Potential Therapeutic Targets†. *Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2006;49(11):3322-31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jm0512241>
8. Bonse S, Richards JM, Ross SA, Lowe G, Krauth-Siegel RL. (2,2':6',2'':-Terpyridine)platinum(II) Complexes Are Irreversible Inhibitors of Trypanosoma cruzi Trypanothione Reductase But Not of Human Glutathione Reductase. *Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2000;43(25):4812-21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jm000219o>
9. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer Aided-Drug Design* [Internet]. 2011;7(2):146-57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cadd.201100014>

org/10.2174/157340911795677602

10. Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular Docking. Molecular Modeling of Proteins [Internet]. 2008;365-82. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19

11. Figueiredo KA, Figueiredo JFS, Costa RKM, Alves MMM, Magalhães JL, Carvalho ALM, et al. Prospecting Biochemical Targets for in silico Study for Antileishmania Chemotherapy. *Revista Virtual de Química* [Internet]. 2018;10(5):1485-501. Available from: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20180101>

12. Dennington RD, Keith TA, Millan JM. GaussView, v. 5.0.8, Semicchem, Inc.: Shawnee KS, 2008.

13. Araújo JL, Sousa AO, Bastos RS, Santos GT, Araújo JL, Rocha JA. Estudo in silico da atividade biológica por docagem molecular da desloratadina contra esquistossomose. *Revista Eletrônica Acervo Saúde* [Internet]. 2019;28(sup):e993. Available from: <https://doi.org/10.25248/reas.e993.2019>

14. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian09, Revision C.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2010.

15. Berman HM. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2000;28(1):235-42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/28.1.235>

16. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* [Internet]. 2004;25(13):1605-12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>

17. Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for Ligand-Receptor Docking. *Current Protocols in Bioinformatics* [Internet]. 2008;24(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/0471250953.bi0814s24>

18. Rocha JA, Rego NCS, Carvalho BTS, Silva FI, Sousa JA, Ramos RM, et al. Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. Chen M, editor. *PLOS ONE* [Internet]. 2018;13(6):e0198476. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0198476>

19. Gasteiger J, Marsili M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* [Internet]. 1980;36(22):3219-28. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(80\)80168-2](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(80)80168-2)

20. Solis FJ, Wets RJ-B. Minimization by Random Search Techniques. *Mathematics of Operations Research* [Internet]. 1981;6(1):19-30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1287/moor.6.1.19>

21. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry* [Internet]. 1998;19(14):1639-1662. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B)

22. Ramos RM, Perez JM, Baptista LA, de Amorim HLN. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* with isoniazid: a computational study on a new possible mechanism of resistance. *Journal of Molecular Modeling* [Internet]. 2012;18(9):4013-24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00894-012-1383-6>

23. Jaffe CL, Dwyer DM. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. *Parasitology Research* [Internet]. 2003;91(3):229-37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-003-0960-0>

24. DeFrees SA, Sawick DP, Cunningham B, Heinstein PF, James Morrè D, Cassady JM. Structure-activity relationships of pyrimidines as dihydroorotate dehydrogenase inhibitors. *Biochemical Pharmacology* [Internet]. 1988;37(20):3807-3816. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90060-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(88)90060-3)

25. K. Vyas V, Ghate M. Recent Developments in the Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential of Dihydroorotate Dehydrogenase (DHODH) Inhibitors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [Internet]. 2011;11(12):1039-55. Available from: <http://dx.doi.org/10.2174/138955711797247707>

26. Palfey BA, Björnberg O, Jensen KF. Specific Inhibition of a Family 1A Dihydroorotate Dehydrogenase by Benzoate Pyrimidine Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2001;44(18):2861-4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jm015535x>

27. Arakaki TL, Buckner FS, Gillespie JR, Malmquist NA, Phillips MA, Kaluzhnyi O, et al. Characterization of *Trypanosoma brucei* dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. *Molecular Microbiology* [Internet]. 2008;68(1):37-50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06131.x>

28. Cheleski J, Rocha JR, Pinheiro MP, Wiggers HJ, da Silva ABF, Nonato MC, et al. Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2010;45(12):5899-909. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.055>

29. Araújo JL, Bastos RS, Santos GT, Araújo JL, Rocha JA. Evaluation by molecular docking of inhibitors of the enzyme pteridine reductase 1 from *Leishmania*. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde* [Internet]. 2019;5. Available from: <http://dx.doi.org/10.26694/repis.v5i0.9056>

30. Cavazzuti A, Paglietti G, Hunter WN, Gamarro F, Piras S, Loriga M, et al. Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2008;105(5):1448-1453. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0704384105>

31. Tulloch LB, Martini VP, Iulek J, Huggan JK, Lee JH, Gibson CL, et al. Structure-Based Design of Pteridine Reductase Inhibitors Targeting African Sleeping Sickness and the Leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2010;53(1):221-229. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jm901059x>

32. Mpamhanga CP, Spinks D, Tulloch LB, Shanks EJ, Robinson DA, Collie IT, et al. One Scaffold, Three Binding Modes: Novel and Selective Pteridine Reductase 1 Inhibitors Derived from Fragment Hits Discovered by Virtual Screening. *Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2009;52(14):4454-4465. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jm900414x>

33. Khalaf AI, Huggan JK, Suckling CJ, Gibson CL, Stewart K, Giordani F, et al. Structure-Based Design and Synthesis of Antiparasitic Pyrrolopyrimidines Targeting Pteridine Reductase 1. *Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2014;57(15):6479-6494. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jm500483b>

34. Laudet V, Gronemeyer H. PXR. *The Nuclear Receptor FactsBook* [Internet]. 2002;220-226. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012437735-6/50022-9>

35. Breliet Y, Kammerer S, Rochel N, Poch O, Moras D. Signature of the oligomeric behaviour of nuclear receptors at the sequence and structural level. *EMBO reports* [Internet]. 2004;5(4):423-429. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400119>

36. Lamerz A-C, Damerow S, Kleczka B, Wiese M, van Zandbergen G, Lamerz J, et al. Deletion of UDP-glucose pyrophosphorylase reveals a UDP-glucose independent UDP-galactose salvage pathway in *Leishmania major*. *Glycobiology* [Internet]. 2010;20(7):872-882. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwq045>

37. Aragao D, Fialho AM, Marques AR, Mitchell EP, Sa-Correia I, Frazao C. The Complex of *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 Glucose-1-Phosphate Uridyltransferase with Glucose-1-Phosphate Reveals a Novel Quaternary Structure, Unique among Nucleoside Diphosphate-Sugar Pyrophosphorylase Members. *Journal of Bacteriology* [Internet]. 2007;189(12):4520-4528. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00277-07>

38. Roeben A, Plitzko JM, Körner R, Böttcher UMK, Siegers K, Hayer-Hartl M, et al. Structural Basis for Subunit Assembly in UDP-glucose Pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* [Internet]. 2006;364(4):551-560. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.08.079>

39. Lamerz A-C, Haselhorst T, Bergfeld AK, von Itzstein M, Gerardy-Schahn R. Molecular Cloning of the *Leishmania major* UDP-glucose Pyrophosphorylase, Functional Characterization, and Ligand Binding Analyses Using NMR Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2006;281(24):16314-16322. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m600076200>

40. Steiner T. Open and Closed Structures of the UDP-Glucose

Pyrophosphorylase from *Leishmania major*. Worldwide Protein Data Bank. 2007. Available from: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb2oef/pdb>

41. Flohé L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *Biotechnology Advances* [Internet]. 2012;30(1):294-301. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.012>

42. Maltezou HC. Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [Internet]. 2009;2010:1-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/617521>

43. Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiology* [Internet]. 2002;4(11):701-711. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00226.x>

44. Ouakad M, Chenik M, Ben Achour-Chenik Y, Louzir H, Dellagi K. Gene expression analysis of wild *Leishmania major* isolates: identification of genes preferentially expressed in amastigotes. *Parasitology Research* [Internet]. 2006;100(2):255-264. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-006-0277-x>

45. Morty RE, Troeberg L, Pike RN, Jones R, Nickel P, Lonsdale-Eccles JD, et al. A trypanosome oligopeptidase as a target for the trypanocidal agents pentamidine, diminazene and suramin. *FEBS Letters* [Internet]. 1998;433(3):251-256. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00914-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00914-4)

46. McLuskey K, Paterson NG, Bland ND, Isaacs NW, Mottram JC. Crystal Structure of *Leishmania major* Oligopeptidase B Gives Insight into the Enzymatic Properties of a Trypanosomatid Virulence Factor. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2010;285(50):39249-39259. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.156679>

47. Araújo JL, Bastos RS, Santos GT, Alves MMM, Figueiredo KA, Sousa LA, et al. Molecular docking and evaluation of antileishmania activity of a ruthenium complex with epiisopiloturine and nitric oxide. *Journal of Biosciences and Medicines* [Internet]. 2020; 8(5):42-53. Available from: <https://doi.org/10.4236/jbm.2020.85005>.